

Hemorrhagiás shock és a fehérjék O-típusú N-acetil-glükózamin módosulása

Dr. Nőt László Gergely

Mentor:

Prof. Róth Erzsébet, DSc

PhD Programvezető:

Prof. Róth Erzsébet, DSc

PhD Iskola Vezetője:

Prof. Komoly Sámuel, DSc

**Traumatológiai és Kézsebészeti Tanszék, Mozgásszervi Sebészeti
Intézet**

Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

Általános Orvostudományi Kar, Pécsi Tudományegyetem

Pécs, 2011

RÖVIDÍTÉSEK

ATP: adenzin-5'-trifoszfát

ADP: adenzin-difoszfát

ALT: alanin-aminotranszferáz

AST: aszpartát-aminotranszferáz

BSA: bovine szérum albumin

BUN: blood urea nitrogen

CTD 110.6: C-terminális domain

cTnl: cardiac troponin I

DRP: drag-reducing polymer

eNOS: endotheliális nitrit oxid szintáz

ER: endoplazmatikus reticulum

GalNAc: N-acetil-galaktózamin

GAPDH: glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz

GFAT: Glutamin: fruktóz-6- foszfát amidotranszferáz

GlcN: glükózamin-hidroklorid

GlcNAc: N-acetil-glükózamin

Glc-6-P: glükóz-6-foszfát

GP: glikogén foszforiláz

GRP78: glükóz regulált protein 78

GSH: redukált glutation

H₂O₂: hidrogen-peroxid

HBP: hexózamin bioszintézis útvonal

HES: hydroxyethyl-strach

HSP: hő-shock protein

ICAM: intercellularis adhézións molekula

iNOS: indukálható nitrit oxid szintáz

IL: interleukin

LDH: laktát-dehidrogenáz

LVDP: left ventricular developed pressure

MAP: mean arterial pressure (artériás középnyomás)

MODS: multiple organ dysfunction syndrome (többszervi elégtelenség)

MPO: myeloperoxidáz

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NAG-thiazoline: 1,2 dideoxy-2'-methyl- α -D-glucopyranoso(2,1-d)- Δ 2'-thiazoline

NF- κ B: nucleáris faktor kappa-B

OGN: N-acetil-glükózaminidáz, O-GlcNAcáz

O-GlcNAc: O-típusú N-acetil-glükózamin

OGT: O-glucoronil transzferáz, O-GlcNAc transzferáz

PAGE: polyacrylamide gél elektroforézis

PCA: perklór sav

PUGNAc: O-(2-acetamido-2-deoxy-d-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate)

ROS: reactive oxygen species / reaktív oxygen gyök

SIRS: systemic inflammatory response syndrome / szisztémás gyulladásos válaszreakció

SDS: sodium dodecyl szulfát

TH-R: trauma-hemorrhage and resuscitation / traumás-hemorragiás shock és folyadékpótlás

TNF: tumor nekrosis faktor

TTO4: 2[(4-chlorophenyl)imino]tetrahydro-4-oxo-3-[2-tricyclo(3.3.1.1^{3,7})dec-1-ylethel]

UDP-GlcNAc: uridine difoszfó-N-acetil-glükózamin

UDP-GalNAc: uridine difoszfó-N-acetil-galaktózamin

UDP-HexNAc: uridine difoszfó-N-acetil-hexózamin

BEVEZETÉS

Trauma és a hemorrhagiás shock

Az elmúlt években elért fejlesztések ellenére a közlekedés biztonság és a munkavédelem terén, a súlyos sérülések a vezető halálokok között szerepelnek mind a civil, mind a hadszíntéri környezetben. Fontos megjegyezni, hogy a trauma a vezető halálokok a 35 év alattiak körében. Az Európai Unióban évente 235.000 haláleset fordul elő sérülések következtében, melynek 2/3-a baleset eredménye.

A hemorrhagiás shock korai kezelése sebészi beavatkozából és a keringő vértérfogat pótlásából áll krisztalloid/kolloid oldatok és vértranszfúzió segítségével. Azonban, a masszív folyadékpótlás a vérzés sebészi kontrollja előtt további vérvesztést és nagyobb mortalitást eredményezhet. Az utóbbi időben egyre növekszik az érdeklődés minimális volumenbevitellel járó kezelési lehetőségek iránt, főleg a lakott területtől távol eső régiókban, illetve a hadszíntéren, ahol az azonnali sebészi beavatkozás nem mindig elérhető, másrészt a sérültek szállítási ideje is jelentős.

A jelentős vérvesztéssel járó súlyos sérülések hypovolémiás shock-ot eredményeznek, mely csökkent szöveti perfúzióval és az oxigén igény / szükséglet közötti egyensúly felborulásával jár. A hemorrhagiás shock ugyancsak gyakran jár együtt pro-inflammatorikus mediátorok és szabadgyökök felszabadulásával. A gyulladásos mediátorok túlzott felszabadulása, azaz a szisztémás gyulladásos válaszreakció (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) jelentős tényező a többszervi elégtelenség kialakulásában (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS). A többszervi elégtelenség incidenciája (11.4%) és mortalitása (61%) igen jelentős súlyos sérüléseket követően.

Összefoglalva, a szövetkárosodás és a gyulladásos mediátorok túlzott felszabadulásának megelőzése szignifikánsan csökkenthetné a trauma okozta mortalitást. Napjainkig a jól bevált kezelési protokollok – gyors sebészi beavatkozás és intenzív terápia – mellett csak néhány új gyógyszeres kezelés hatékonyságát sikerült igazolni multicentrikus, humán tanulmányokkal. ***Mindezért fokozott igény van új, gyógyszeres kezelési eljárások kidolgozására a súlyos sérültek ellátásában, mind a korai túlélés javítására, mind a későbbi szövődmények hatékony megelőzése érdekében.***

Trauma és a stressz-indukálta hyperglykémia

Akut hyperglykémia gyakran alakul ki traumát és hemorrhagiás shock-ot követően. A stress kiváltotta hyperglykémiáról kimutatták, hogy adaptív mechanizmusként is szolgálhat. Ennek bizonyítéka, hogy ezen válaszreakció kioltása táplálék-megvonást követően növeli a traumás kivérzéses shock mortalitását patkány állatmodellen. Más szemszögből nézve, az elmúlt évek klinikai gyakorlata alapján, a korai euglykémias kontroll javítja az intenzív osztályon kezelt sérültek állapotának kimenetelét. ***Fontos megjegyezni, hogy az emelkedett vércukorszint növeli a hexózin bioszintézis útvonalon való átáramlást, melyről igazolták, hogy többek között javítja a sejtek túlélését stressz körülmények között.***

A Hexózin Bioszintézis Útvonal (Hexosamine Biosynthesis Pathway, HBP) és a fehérjék O-GlcNAc módosulása

In vitro sejt kultúrán végzett tanulmányok alapján a sejtek által felvett glükóz közel 2-5%-a lép be a hexózin bioszintézis útvonalba (HBP; 1. ábra). A belépés folyamatát és sebességét az L-glutamin-D-fruktóz 6-foszfát amidotranszferáz (GFAT) szabályozza, mely a fruktóz-6-foszfátot alakítja glükózamin-6-foszfáttá, glutamint használva amino-csoport donorként. A glükózamin-6-foszfát átalakulása számtalan intermedier terméken keresztül a UDP-GlcNAc szintéziséhez vezet. Az UDP-GlcNAc glikozid prekursoraként szerepel glikoproteinek, glikolipidek és proteoglikánok szintézisébe, ugyanakkor, esszenciális cukor-nukleotid donor a fehérjék O-GlcNAc módosulásához.

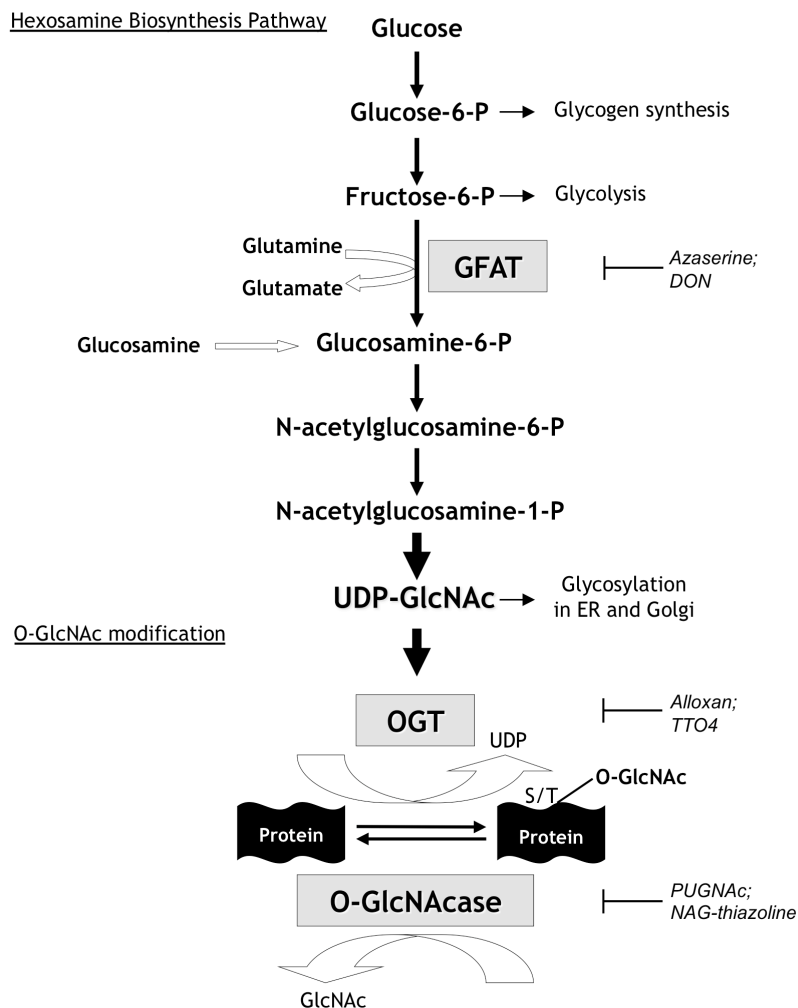
Az O-GlcNAc szerepét a sejt funkció szabályozásában számos betegséggel köthetjük, így inzulin-reszisztencia és diabetes mellitus, valamint daganatok kialakulásához, neurodegeneratív betegségekhez, mint pl. az Alzheimer-kór. Ugyanakkor, a leírt adreális hatások mellett Zachara N és mtsai igazolták, hogy emlős sejteket ért celluláris stressz kiváltotta fehérje O-GlcNAc módosulás növeli a sejtek ellenálló képességét a stressz hatásokkal szemben.

A HBP-n való átáramlás kísérleti úton növelhető exogén glükózamin adásával, mely a glükóz transzporter rendszeren kerül jut be a sejtekbe, glükózamin-6-foszfáttá foszforilálódik hexokinázok által, így képes megkerülni a HBP sebességét szabályozó GFAT enzimet, ezáltal gyors UDP-GlcNAc szint emelkedést eredményez.

A fehérje O-GlcNAc módosulás szabályozása

A sejt magban és a citoszolban elhelyezkedő fehérjéken a β -N-acetil-glükózamin O-helyzetű kötődése (O-GlcNAc) meghatározott szerin/threonin kötőhelyekhez az O-GlcNAc transzferáz (O-GlcNAc transferase, OGT) enzim által történik, UDP-GlcNAc-et használva szükséges szubsztrátként. Az O-GlcNAc módosulás mértéke szorosan függ a HBP keresztül történő átáramlástól, hiszen az OGT katalitikus aktivitása igen érzékeny az UDP-GlcNAc koncentráció változásához. A sejt magban és a citoplazmában lévő fehérjék O-GlcNAc szintjét ugyancsak szabályozza a β -N-acetil-glükózaminidáz (O-GlcNAcase, OGN) enzim, mely az O-GlcNAc csoport leválasztását katalizálja a fehérjéről. Az OGT-vel ellentétben, mely elsődlegesen a sejt magban található, az OGN aktív formája predominánsan a citoplazmában (90%) van jelen. Érdeklőség, hogy a közelmúltban megjelent tanulmányok támogatják azt a korábbi elméletet, mely szerint összetett és reciprok kapcsolat van a foszforiláció és az O-glikoziláció között – tekintettel arra, hogy a foszforilációt végző kinázok ugyancsak a szerin/threonin kötőhelyeket célozzák.

Az O-GlcNAc csoport kötődésének és leválasztásának sebességéről rendelkezésre álló adatok erősen korlátozottak, tekintettel arra, hogy jelenleg nem áll rendelkezésre specifikus, nagy affinitású OGT inhibitor. Mindezt, a legszélesebb körben használt farmakológiai megközelítés az O-GlcNAc szint befolyásolására az O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc), egy ineffektív O-GlcNAc analóg használata, mely hatékony és viszonylag specifikus kompetitív inhibitor a O-GlcNAcáz-nak. Az OGN gátlása révén a PUGNAc lassítja vagy éppen megelőzi az O-GlcNAc csoport leválasztását, ezáltal viszonylag gyors O-GlcNAc szint emelkedéshez vezet. A PUGNAc hatékonysága az O-GlcNAc szint emelésében számos biológiai rendszerben már bizonyítást nyert. Az utóbbi időben azonban új O-GlcNAcáz gátlók (NAG-thiazoline, GlcNAcstatin) kerültek felfedezésre, melyek vízzoldékonyak, hatékonyabbak és szelektívebb hatásúak a PUGNAc-nél, ezáltal új távlatokat nyitnak az O-GlcNAc módosulás kutatásában.



1. ábra: A hexozamin bioszintézis útvonal (HBP) és protein O-GlcNAc módosulás. /eredeti ábra: Laczy B és mtsai., *AJP Heart Circ Physiol* 296:13-28, 2009/ glucose-6-phosphate (glucose-6-P), fructose-6-phosphate (fructose-6-P), glucosamine-6-phosphate, L-glutamine-D-fructose 6-phosphate amidotransferase (GFAT), UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), O-diazoacetyl-L-serine (azaserine), endoplasmic reticulum (ER), uridine-diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide β -N-acetylglucosaminyltransferase (OGT), O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc), β -N-acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase), uridine analog: alloxan 2[(4-chlorophenyl)imino]tetrahydro-4-oxo-3-[2-tricyclo(3.3.1.1^{3,7})dec-1-ylethel] (TTO4), O-(2-acetamido-2'-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate (PUGNAC), 1,2 dideoxy-2'-methyl-D-glucopyranoso(2,1-d)-2'-thiazoline (NAG-thiazoline). S/T, serine/threonine.

A protein O-GlcNAc módosulás és az ischemia-reperfúziós károsodás

Egyre több irodalmi adat támasztja alá azt a megfigyelést, hogy azon jelátviteli útvonalak aktiválása, melyek O-GlcNAc szint emelkedéséhez vezetnek, növelik a toleranciát stressz-el szemben és javítják a sejtek túlélését. Neonatalis cardiomyocytákban kimutatták, hogy a hypoxia-reoxygenizáció átmeneti O-GlcNAc szint emelkedéshez vezet, és ezen válaszreakció erősítése megemelt glükóz szinttel, exogén glükózamin adásával vagy PUGNAC kezelés segítségével növeli a sejtek életképességét, csökkenti a necrosist és az apoptózist. Izolált perfundált szívben, glükózamin vagy glutamin segítségével növelt HBP átáramlás az ischemia kezdete előtt szignifikánsan növeli az O-GlcNAc szintet, javítja a kontraktilis funkciót és csökkenti a reperfúziót követő szöveti károsodást.

Mindezek mellett, Laczy B és mtsai izolált perfundált patkányszíven kimutatták, hogy az OGN gátlása a reperfúzió során adagolt NAG-thiazolin segítségével emeli az O-GlcNAc-szintet és egyben jelentős kardioprotektív hatással bír. Lényeges megjegyezni, hogy eredményeik alapján az OGN gátlása klinikailag releváns megközelítés lehet az ischemia alatti kardioprotekció terén, részben, mert az O-GlcNAc csoport megőrzi a Z-vonalak protein struktúrájának integritását. Más kutatócsoport kimutatta, hogy a PUGNAc *in vivo* adása csökkenti az ischemia-reperfúziót követően kialakuló infarktus méretét egér szívben.

Számos feltételezés látott napvilágot azon mechanizmusra, mely magyarázattal szolgálna a stresszel szembeni fokozott ellenálló képességre emelkedett O-GlcNAc szint esetén. A megnövelt O-glikoziláció összefüggésbe hozható fokozott HSP (hő-shock protein, heat shock protein) 40 és HSP70 transzkripcióval, melyek közül az utóbbi fehérje maga is célpontja az O-GlcNAc módosulásnak. Előzetes tanulmányok alapján elmondhatjuk, hogy az ischemia-reperfúzió változást okoz a glikogén foszforiláz-b, a mitokondriális akonitáz-2 és a cytoskeletális vinkulin O-GlcNAc módosulásában. Emelkedett O-GlcNAc módosulásról kimutatták továbbá, hogy gátolja bizonyos fehérjék lebomlását, feltehetőleg a proteasome gátlása révén, mely szintén hozzájárulhat a sejtek jobb túléléséhez. Ugyancsak lehetséges, hogy a kardioprotekció a reperfúzió okozta Ca^{2+} -túltelítődés megakadályozása révén jön létre.

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az emelkedett O-GlcNAc szint sejteken és izolált szerveken igazolt védő hatását következő lépcsőként, in vivo környezetben is érdemes tanulmányozni.

A protein O-GlcNAc módosulás, hemorrhagiás shock és inflammáció

A traumával kombinált hemorrhagiás shock modellek széles körben elterjedtek olyan szituációk modellezésére, melyek során a súlyos sérüléshöz jelentős vérvesztesség társul. Ezen modellek jórésze kísérletes úton, rágszálakon létrehozott lágyrészkárosodás és vérlebocsátás kombinációján alapul, melyet folyadék és/vagy vérvisszapótlás követ. A traumás hemorrhagiás shock modellek okozta károsodás pathomechanizmusa lényegében az ischemia-reperfúziós károsodás elvén alapul. Korábban igazolást nyert, hogy a glükózamin vagy PUGNAc *in vivo* adása folyadékpótlás során szignifikánsan javítja a cardiac output-ot és növeli a kritikus szervrendszerek szöveti perfúzióját a kontroll állatokhoz képest, 2 órával a hemorrhagiás shock-ot követően. Glükózamin vagy PUGNAc *in vivo* adása szintén szignifikánsan növelte a fehérjék O-GlcNAc módosulását számos szövetben, alátámasztva azt az elméletet, mely szerint az emelkedett O-GlcNAc szint a sejtmagban és a cytoplazmában található fehérjéken felelős az említett protektív hatásokért.

Számos tanulmány bizonyította, hogy az O-GlcNAc szint akut emelkedése csökkenti a szövetskárosodást és a stressz okozta gyulladásos válaszreakciót. Az O-glikoziláció akut aktiválása ugyancsak protektívnek bizonyult *in vivo* endoluminális érsérülést követő gyulladás elhárításában. Glükózaminnal és PUGNAc-el történő előkezelés növelte az O-glikozilációt ballon-okozott patkány carotis artéria sérülést követően a kontroll állatokhoz viszonyítva. Izolált cardiomyocytaiban mind a glükózamin, mind az OGT overexpresszió növelte az O-GlcNAc szintet, csökkentette az LPS (lipopoliszacharid) indukálta TNF- α és ICAM-1 (intracelluláris adheziós molekula, intracellular adhesion molecule) expressziót, valamint csökkentette az I κ B- α foszforilációt és ezáltal a sejtmagban beáramló NF- κ B szintjét. Nemrég bizonyításra került, hogy az O-GlcNAcáz inhibitor PUGNAc kezelés szignifikánsan csökkentette az IL-6 szintjét a szérumban és a BAL (bronchoalveolar lavage) folyadékban, valamint csökkentette az ICAM-1 expresszióját a tüdőben CLP (cecum punctió és lekötés, cecal puncture and ligation) indukálta szepszist követően patkányokban. A PUGNAc előidézte csökkenés a CLP okozta gyulladásos reakcióban együtt járt az O-GlcNAc szint nagyjából kétszeresére való emelkedésével.

Ezen eredmények tovább erősítetik azt a feltételezést, hogy az emelkedett O-GlcNAc szint javíthatja a túlélést, csökkentheti a szervkárosodást és a gyulladást súlyos hemorrhagiás shock-ot követően.

CÉLKITŰZÉS

A fehérjék O-GlcNAc módosulása olyan posztranszlációs módosulás, melyről igazolást nyert, hogy javítja a sejtek túlélését ischemia-reperfúziós károsodást követően. A súlyos sérülések napjainkban a vezető halálokok között szerepelnek és szükség van új, metabolikus kezelési eljárásokra, melyek tovább javíthatnák a súlyosan sérülést betegek túlélését és csökkenthetnék az életet veszélyeztető szövődmények kialakulását. Mindezért, tanulmányunkban az alábbi célokat tűztük ki:

» Az emelkedett O-GlcNAc szint hatásának vizsgálata a rövid-távú kimenetelre súlyos traumás hemorrhagiás shock-ot követően patkányokban

- A tanulmány első részének fő célja az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen hatása van a kistérfogató, bolus injekcióban intravénásan beadott glükózaminnak súlyos hemorrhagiás shock-ot követően érdemi volumenpótlás hiányában a túlélésre, a hemodynamikus paraméterekre és a szövetek energetikai állapotára.
- Szintén megvizsgáltuk, hogy a felsorolt változások együtt járnak-e emelkedett fehérje O-GlcNAc módosulással a szív, az agy és a máj szövetekben.

» Az emelkedett O-GlcNAc szint hatásának vizsgálata a későbbi kimenetelre súlyos traumás hemorrhagiás shock-ot követően patkányokban

- A tanulmány második részének célja az volt, hogy meghatározzuk a glükózamin vagy a PUGNAc által előidézett O-GlcNAc szint emelkedés hatását a 24 órás túlélésre súlyos traumás hemorrhagiás shock-ot és teljes folyadékpótlást követően patkányokban.
- Szintén megvizsgáltuk, hogy a túlélésre gyakorolt hatás mellett csökkenti-e az emelkedett O-glikoziláció a szervkárosodást, az apoptosist és a szisztémás gyulladásos válaszreakciót.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Rövid-távú (2 órás) traumás hemorrhagiás shock modell: Kísérleteink során olyan hemorrhagiás shock modellt alkalmaztunk, melynek érdemi folyadékpótlás nélkül a kivéreztetést követően 35 perccel 0%-os a túlélési esélye. Röviden, isofluran anesztézia alatt (1.5% vol/vol, 1 L/perc oxygen áramlás), mindkét femorális artériába és a jobb oldali femorális vénába kanült helyeztünk a folyamatos artériás középnyomás mérése, vérlebocsátás és gyógyszerbeadás céljából. Ezt követően 5 cm-es középvonali laparotómiát végeztünk, ezzel modellezve a traumát jelentő lágyrészkárosodást. Az állatokat 37 °C-ra beállított melegítő padon tartottuk a centrális testhőmérséklet fenntartása érdekében. A kivéreztetés során infúziós pumpa segítségével 55%-át bocsátottuk le a becsült vértérfogatnak (teljes vértérfogat [mL] = testsúly [g] × 0.061) 25 perces idő intervallum alatt.

Kísérleti csoportok: A kivéreztetést követően az állatokat véletlenszerűen két csoportba osztottuk: glükózámmal és mannitollal kezelt (kontroll) csoport. Tekintettel a glükózamin viszonylag magas osmolaritására, mannitolt használtunk a kontroll csoport esetében, mind izo-osmotikus kontrollt. A glükózámmal kezelt csoportban 2.5 mL, 150 mM koncentrációjú glükózamin oldat került intravénásan beadásra 10 perc alatt. Az állatok ezt követően nem részesültek további folyadék pótlásban. Az állatokat 2 órán keresztül figyeltük meg a kezelést követően, illetve elpusztulásuk időtartamáig (apneas idő > 1 perc). A kísérlet végén a túlélő állatokon eutanáziára került sor, altatásban intravénásan beadott koncentrált kálium-klorid oldat segítségével. Ezt követően szérum és különböző szöveti mintákat gyűjtöttünk.

Hosszú-távú (24 órás) traumás hemorrhagiás shock modell: Az előzőekben leírt modellt adaptáltuk a hosszabb távú túlélés tanulmányozására: a vérlebocsátás után 45 perces vérnyomás-kontrollált fázis (csökkentett artériás középnyomás) került beiktatásra, majd ezt követően teljes folyadékpótlást biztosítottunk. A kivéreztetés a becsült vértérfogat 55%-nak lebocsátásával történt 25 perc alatt. Ezt követően, az artériás középnyomást 35-40 Hgmm-en tartottuk 45 perces idő intervallumra (nyomás-kontrollált fázis) kis térfogatú, i.v. fiziológiás sóoldattal szükség szerinti adásával, a beadott folyadékpótlás ez időszak alatt nem haladhatta meg a lebocsátott vértérfogat 40%-át. Ezt követően teljes folyadékpótlásra került sor, a lebocsátott vértérfogat 4X-nek megfelelő térfogatú 0.9%-os fiziológiás sóoldat segítségével 60 perc alatt. Ezután az artériás és a vénás kanülok eltávolításra kerültek, a sebeket bezártuk, az állatokat felébresztettük és 24 órás megfigyelési időszak következett. A 24 órát túlélő állatokon eutanáziára került sor, altatásban intravénásan beadott koncentrált kálium-klorid oldat segítségével. Szérumból, vérből illetve a szív, tüdő és a máj szövetekből történt mintavétel későbbiekben részletezett vizsgálatok céljából. Azon állatok, melyek a 24 órás megfigyelés során moribund állapotba kerültek, eutanáziára került sor és a túlélés szempontjából elpusztult állatként kerültek nyilvántartásra.

Kísérleti csoportok: az állatokat véletlenszerűen a következő 4 csoportba osztottuk: 1) Áloperált ('sham'-operated); 2) Kontroll: kivéreztetett és fiziológiás sóoldattal kezelt; 3) Glükózamin: kivéreztetett és 270 mg/ttkg glükózámmal kezelt és 4) PUGNAc: kivéreztetett és 7 mg/ttkg PUGNAc-el kezelt állatok. Mindkét kezelt csoportban a teljes dózis 25%-a 2 mL-es bolusban közvetlenül a kivéreztetést követően, a maradék 75% pedig a 60 perces folyadékpótlás alatt folyamatosan került beadásra. Az áloperált ('sham') állatok esetében csak altatásra és kanülálásra került sor, vérlebocsátás nélkül. Minden kísérleti állat esetében 0.3 mg/ ttkg buprenorphine került s.c. beadásra közvetlenül, illetve 12 órával a folyadékpótlást követően fájdalom csillapítás céljából.

Vérgáz analízis, szérumszint, glükóz, laktát és elektrolitszint mérések: artériás mintavételt követően a vérgáz paramétereket kereskedelmi forgalomban lévő vérgáz-analizátor segítségével mértük. Az alanin-transzamináz (ALT), aszpartát-transzamináz (AST), laktát dehidrogenáz (LDH), amyláz, creatinin és vér urea nitrogén (blood urea nitrogen, BUN) szintek enzimatis reakció segítségével kerültek mérésre.

Szérumszintek: interleukin- (IL) 6 és 10; valamint tumor necrosis factor (TNF)- α szintek meghatározása kereskedelmi forgalomban lévő ELISA (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) készlet segítségével történt, követve a gyártó utasításait.

Western-immunoblot analízis: a proteinek 7-10 % SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel) elektroforézis gélen történt szeparálást követően PVDF (polyvinylidene difluoride) vagy nitrocellulóz membránokra kerültek transzferálásra. Az egyenlő fehérje feltöltést Sypro Ruby (Bio-Rad) festés segítségével ellenőriztük. A membránokat 16 órán keresztül inkubáltuk 1:1000 vagy 1:2500 arányban hígított CTD 110.6 (anti-O-GlcNAc), foszfoszerin, foszfothreonin, GRP78 vagy iNOS antitesttel. A feltöltést a membránok előző antitesttől történő megtisztítását követően β -actin vagy calnexin antitest segítségével ismétellen ellenőriztük. A denzitometria a CTD 110.6 és a foszfoszerin / foszfothreonin immunoblottok esetében úgy történt, hogy az egész oszlop (összes protein-sáv) került kijelölésre, majd az átlagos denzitást számítottuk ki a háttér-intenzitás levonását követően, Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD) segítségével.

Magas-nyomású folyadék kromatográfiás mérések (high performance liquid chromatography, HPLC): a szöveti adenzin trifoszfát (ATP) szint mérése: frissen fagyasztott szöveti törmelék 0.3M perchlor-savban került homogenizálásra, majd 10 percig centrifugáltuk 4 °C-os hőmérsékleten 14,000 g fordulaton; ezt követően a felülúszót 1:4 triethylamine:1,1,2-trichlorotrifluoroethane-al kevertük. A keveréket újabb 5 percig centrifugáltuk 4 °C-on; majd a vizes fázist strong anion exchange (SAX) oszlopon futtattuk 262-nm-es hullámhosszra állítva a detectort. Szérumszintek: 0.1 mL szérumszint adtunk 0.4 mL acetonitrile-hez a szérumszint fehérjék kicsapása céljából. A megtisztított és szárított mintákat 0.2 mL, 88 mg/mL koncentrációjú 1-naphthyl-isothiocyanate segítségével derivatizáltuk, mely reakciót 0.4 mL, 1.5% ecetsavval állítottunk meg. A fel nem használt derivatizáló reagenst organikus fázisba partícionáltuk 1.0 mL kloroform hozzáadásával, a felülúszó vizes fázist pedig tovább tisztítottuk anion-cserélő oszlop segítségével, majd az oszlopról leoldott fázist ODS2 analitikai oszlopon futtatuk, isocratic rendszeren. Az adatok feldolgozása System Gold Nouveau software (Beckman Coulter, Fullerton, CA) segítségével történt a görbe alatti terület integrálásával, melyet a mérések elején futtatott ismert standardokéhoz viszonyítottunk.

Nuclearis faktor kappa-B (NF- κ B) aktivitás, apoptózis és myeloperoxidáz (MPO) mérés: az NF- κ B aktivitást ELISA-alapú, kolorimetriás, promóter régiót tartalmazó oligonucleotid-kötő próbával vizsgáltuk. Az apoptózist speciális ELISA-készlet segítségével mértük, a töredezett DNS-hez kötődő hisztonok mennyiségének meghatározásával. Az MPO mennyiségének meghatározása szintén kereskedelmi forgalomban lévő ELISA-készlet segítségével történt.

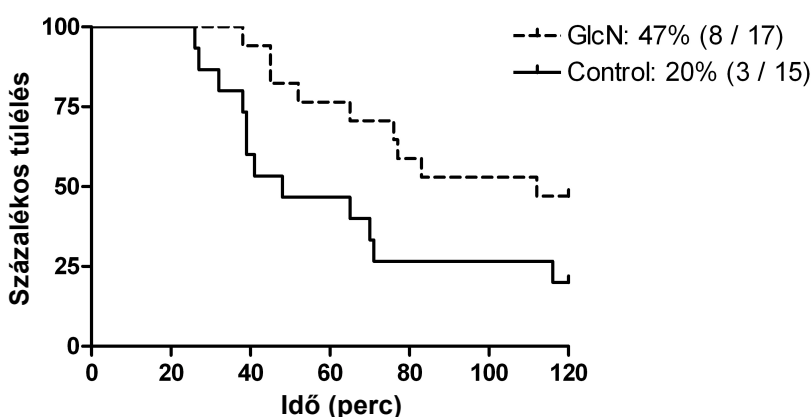
Adatok értékelése: A statisztikai analízist GraphPad Prism 4 software (GraphPad, San Diego, CA) és SPSS13.0 (SPSS, Chicago, IL) software segítségével végeztük. A túlélő görbéket log-rank teszttel elemeztük, az értékeket túlélési százalék formájában ábrázoltuk. Más statisztikai számítások unpaired Student's t teszt, korreláció-analízis vagy paraméteres ANOVA és Bonferroni- vagy Dunnett-féle post hoc tesztekkel történtek. Amennyiben az adatok nem követték a normál eloszlást vagy nem mutattak egyenlő varianciát, log vagy rank transzformációt követően one-way ANOVA vagy Kruskal-Wallis variancia analízis és Dunnett-féle post hoc teszt segítségével kerültek elemzésre.

EREDMÉNYEK

I. Az emelkedett O-GlcNAc szint hatásának vizsgálata a rövid-távú kimenetelre súlyos traumás hemorrhagiás shock-ot követően patkányokban

Túlélés

Összesen 37 állatot vetettünk alá trauma-hemorrhagiás shock modellnek, mely minimális folyadékpótlással jár. A glükózamin kezelés szignifikánsan javította a túlélést a (mannitollal kezelt) kontroll állatokhoz képest (2-órás túlélés: 47% vs. 20%, $p < 0.05$) 2. ábra.



2. ábra: Túlélési százalék az idő függvényében a glükózamminal-kezelt (GlcN) és a Control (mannitollal-kezelt) patkányok esetében ($p < 0.05$, log-rank teszt). A túlélési százalékot, a túlélő állatok és az adott csoportba tartozó összes állat számát mutatja az ábra felirata. Zero (0) perc jelzi a bolus glükózamin beadásának időpontját.

Hemodinamikai paraméterek

Az artériás középnyomás szignifikánsan emelkedett értéket mutatott közel 18 perces időtartam idejére a glükózamminal kezelt csoportban. Hasonló értékeket találtunk, amikor csak azokat az állatokat hasonlítottuk össze, melyek túléltek a 2 órás utánkövetési időszakot.

Artériás vérgáz, szérumbiokémiai paraméterek és szérumbiokémiai szintek:

A $PACO_2$, a sav-bázis egyensúly (pH), a bázis túlsúly (base excess, BE) és a szérumbikarbonát értékek mindkét csoportban csökkentek a traumás hemorrhagiás shock-ot követően az alapértékekhez képest, jelezve a shock súlyosságát. Szignifikánsan emelkedést mutatott a szérumlaktát szint, összhangban a jelentős fokú metabolikus acidosis kialakulásával. A hematokrit érték szignifikánsan csökkent a kivéreztetés végére és további csökkenést mutatott a kezelést követő 30 perc végére. A szérumbiokémiai értékek szignifikánsan emelkedtek mindkét csoportban a kivéreztetést követően, párhuzamosan a shock-os állapot súlyosbodásával.

Ugyanakkor, nem találtunk szignifikáns eltéréseket a szérumból vett mintákban az ALT, AST, LDH, amiláz) és a vesekárosodást jelző kreatinin / BUN arányt illetően egyik mérési időpontban sem. A glükózamin túlélést javító hatása ellenére sem különböztek a fent említett értékek a glükózaminnal kezelt és a kontroll csoportot összehasonlítva.

A bólus glükózamin kezelést követően 30 perccel vett szérumból vett mintákban átlagosan $2.6 \text{ mM} \pm 0.5 \text{ mM}$ glükózamin koncentrációt mértünk. A kontroll és a műtétnek alá nem vetett állatokban a szérumból vett mintákban a glükózamin szint nem volt mérhető tartományban.

A szövetek energetikai állapota

A hemorrágiás shock nem volt hatással az ATP szintre a szívben, az agyban és a harántcsíkolt izomban, ugyanakkor, jelentős ATP csökkenést váltott ki a májszövetből vett mintákban. A glükózamin kezelés egyik szervből vett mintában sem eredményezett szignifikáns javulást a szöveti ATP szintben.

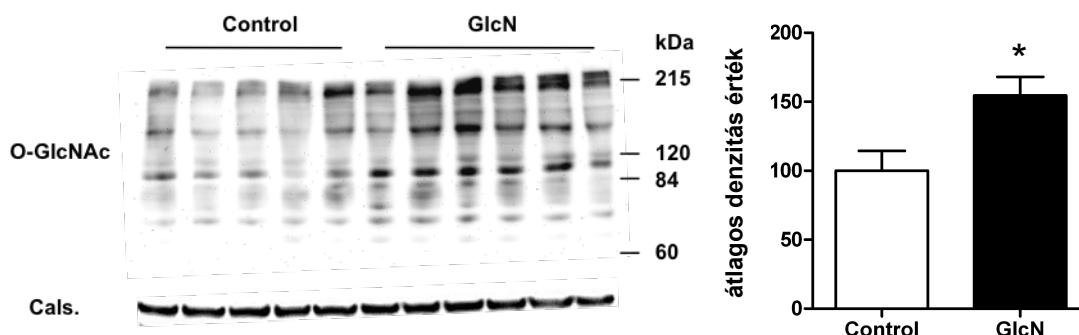
Szérumból vett cytokinek

A szérumból 30 perccel a kezelést követően vett mintákban a TNF- α és az IL-10 kisfokú emelkedést mutatott a műtétnek ki nem tett állatokéhoz képest; ezen értékekre a glükózamin kezelés nem volt hatással. A szérumból vett IL-6 szintek a tanulmányozott időpontban még nem érték el a mérhető tartományt.

Protein O-GlcNAc szintek

Eredetileg a szövetmintákat 2 órával a hemorrágiás shock-ot követően, illetve az állatok elpusztulásának idején vettük, azonban ezen időpontokban vett mintákat összehasonlítva nem találtunk szignifikáns eltérést a szöveti O-GlcNAc módosulás mértékében.

Így kiegészítő kísérleteket végeztünk, mely során a traumás hemorrágiás shock-ot és kezelést követően 30 perccel került sor mintavételre, amikor az artériás közepnyomás szignifikánsan magasabb volt a glükózaminnal kezelt állatokban. Ezen időpontban a glükózamin kezelés szignifikánsan emelkedett O-glikozilációt eredményezett a szívben (3. ábra), az agyban és a májban, kivéve a harántcsíkolt izomból vett mintákban.

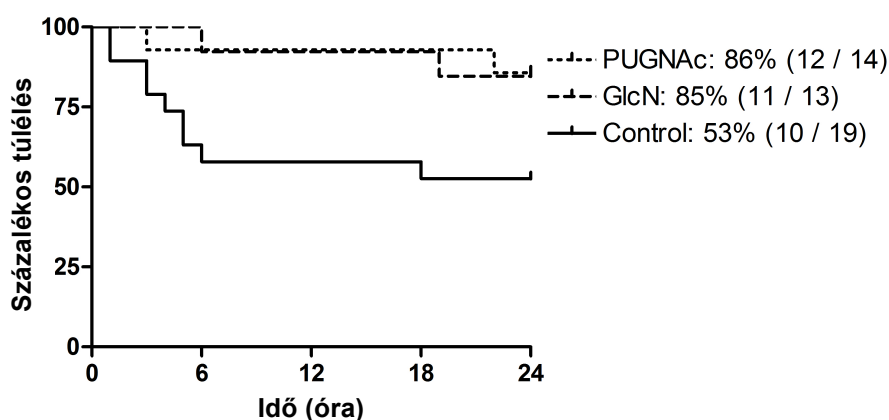


3. ábra: Szív: O-GlcNAc immunoblot 30 perccel a hemorrágiás shock-ot és GlcN (glükózamin) vagy mannitol (Control) kezelést követően. Oszlopdiagramm: normalizált denzitás értékek átlaga \pm SEM. A denzitás értékeket calsequestrinhez (Cals) viszonyítottuk az egyenlő feltöltés ellenőrzése érdekében. Kétminás Student t-teszt, * $p \leq 0.05$ Vs Control.

II. Az emelkedett O-GlcNAc szint hatásának vizsgálata a későbbi kimenetelre súlyos traumás hemorrhagiás shock-ot követően patkányokban

Túlélés

Összesen 50 állatot tettünk ki traumás hemorrhagiás shock kezelésnek, melyet teljes folyadékpótlás követett. Ezt követően az állatokat 24 órán keresztül figyeltük meg. Azon 4 patkány, mely a műtét vagy a korai folyadékpótlás során pusztult el, nem szerepel a későbbi analízisek során. A túlélési százalék szignifikánsan magasabb volt mind a glükózámmal (85%), mind a PUGNAc-el kezelt csoportban (86%) a kontroll állatokéhoz hasonlítva (53%) (4. ábra). Az áloperált csoportban mortalitást nem észleltünk.



4. ábra: Túlélési görbe: túlélési százalék az idő függvényében a Control, Glükózámmal (GlcN) és a PUGNAc-el kezelt patkányok esetében ($p < 0.05$, log-rank teszt). A túlélési százalékot, a túlélő állatok és az adott csoportba tartozó összes állat számát mutatja az ábra felirata. Mind a GlcN, mind a PUGNAc kezelés szignifikánsan javította a túlélést a kontroll állatokhoz képest (log rank test, $p < 0.05$). Zero (0) perc jelzi a folyadékpótlás végét és a 24 órás túlélési periódus kezdetét.

Artériás vérgáz analízis és szérumbiológiai paraméterek

A hemorrhagiás shock súlyosságát a kiváltott hyperkalaemia, hypocalcaemia, súlyos fokú acidosis, illetve a csökkent partiális szén-dioxid nyomás (PACO_2), pH, bikarbonát (HCO_3^-), teljes szén-dioxid (TCO_2), bázis túlsúly (BE) és az emelkedett szérumlaktát szintek jelzik. A vérlebcsojtást követően az acidosis foka minden csoportban egyforma volt, azonban a folyadékpótlás végére a vérgáz paraméterek szignifikánsan javultak mind a glükózámmal, mind PUGNAc-el kezelt csoportban a kontroll állatokhoz viszonyítva, az emelkedett HCO_3^- , TCO_2 , BE és csökkent szérumlaktát szintek alapján.

Szérumbiológiai paraméterek

A hemorrhagiás shock szignifikáns emelkedést eredményezett a pro-inflammatorikus cytokin IL-6 szintjében, 24 órával a folyadékpótlást követően a kontroll csoportban, ugyanakkor ez az emelkedés szignifikánsan alacsonyabb volt a PUGNAc kezelés hatására (Áloperált (Sham): 8 ± 6 , Kontroll: 181 ± 36 , PUGNAc: 42 ± 22 pg/mL, $p < 0.05$). Az áloperált állatokhoz viszonyítva az anti-inflammatorikus cytokin IL-10 csak a kontroll csoportban

emelkedett (Dunnett's posthoc-test ($p < 0.05$), ANOVA: szignifikáns trend, $p = 0.08$). Az áloperált állatokéhoz képest egyik csoportban sem találtunk szignifikáns változást a szérumban TNF- α szintjében 24 órával a hemorrhagiás shock-ot követően.

Nukleáris Faktor kappa-B aktiváció

Az NF- κ B kötődési aktivitása a promóter régiójához szignifikáns emelkedést mutatott a májszövetben mind a kontroll, mind a glükózámmal kezelt csoportban 24 órával a hemorrhagiás shock-ot követően, azonban a PUGNAc kezelés szignifikánsan csökkentette az NF-kappa B fokozott aktivitását. A szívben és a tüdőben nem sikerült kimutatni szignifikáns NF- κ B aktivitást a traumás kivérzéses shock hatására a tanulmányozott időpontban.

Szöveti iNOS (indukálható nitrit oxid szintáz) szintek

Az indukálható nitrit oxid szintáz enzim szintje a kontroll csoportban szignifikáns emelkedést mutatott az áloperált állatokéhoz képest a májban és a szívben. Az emelkedett iNOS szintet szignifikánsan csökkentette a PUGNAc kezelés, míg a glükózamin adása nem bizonyult hatékonynak. Meglepő módon a tanulmányozott időpontban nem találtunk szignifikáns iNOS expressziót a tüdő szövetből vett mintákban.

Myeloperoxidáz (MPO) szintek

A szöveti MPO szignifikánsan emelkedett a kontroll állatokból vett tüdő szövetben 24 órával a hemorrhagiás shock-ot követően az áloperáltakéhoz képest. Ugyanakkor, nem találtunk szignifikáns emelkedést sem a PUGNAc, sem a glükózamin csoportban az áloperált csoporthoz hasonlítva. A szívben és a májban a tanulmányozott időpontban nem változott az MPO szint az áloperáltakhoz képest.

Szervkárosodás és apoptózis

A PUGNAc kezelés szignifikánsan csökkentette a traumás hemorrhagiás shock okozta szérumban alanin-transzamináz (Áloperált: 95 ± 14 , Kontroll: 297 ± 56 , PUGNAc: 126 ± 21 IU, $p < 0.05$), aszpartát-transzamináz (Áloperált: 536 ± 110 , Kontroll: 1661 ± 215 , PUGNAc: 897 ± 155 IU, $p < 0.05$) és laktát-dehydrogenáz (Áloperált: 160 ± 18 , Kontroll: 1499 ± 311 , PUGNAc: 357 ± 99 IU, $p < 0.05$) szintjét, azonban a glükózamin kezelés nem volt hatással a fenti szérumban paraméterekre. A pancreas (amiláz) és vese (kreatinin / BUN) károsodást jelző értékek nem mutattak szignifikáns változásokat a tanulmányozott időpontban egyik csoportban sem az áloperált állatokéhoz viszonyítva.

A májban közel kétszeresére emelkedett apoptózist mértünk a kontroll csoportban az áloperált állatokhoz hasonlítva, ugyanakkor nem észleltünk szignifikáns szöveti apoptózist sem a glükózámmal, sem a PUGNAc-el kezelt csoportokban. A tüdőben a hemorrhagiás shock hatására a kontroll csoportban közel 2.8-szorosra emelkedett apoptózishoz képest szignifikáns csökkenést eredményezett mind a glükózamin, mind a PUGNAc kezelés. A szívben ugyanakkor nem észleltünk szignifikáns változást az apoptózist illetően egyik csoportban sem az áloperált állatokhoz viszonyítva.

Endoplazmatikus reticulum stressz

A GRP78 (glucose regulated protein) a hő-shock protein család tagja és fontos indikátora az endoplazmatikus reticulumot (ER) ért stressznek. Annak felmérésére, hogy milyen mértékben okoz ER-stresszt a traumás-kivérzéses shock, illetve az alkalmazott

kezelési protokoll, megvizsgáltuk a GRP78 fehérje expresszióját a májszövetből vett mintákban. Eredményeink azt mutatják, hogy nem következett be szignifikáns GRP78 emelkedés a kontroll illetve a kezelt csoportokban az áloperált állatokéhoz viszonyítva, 24 órával a hemorrhagiás shock-ot követően.

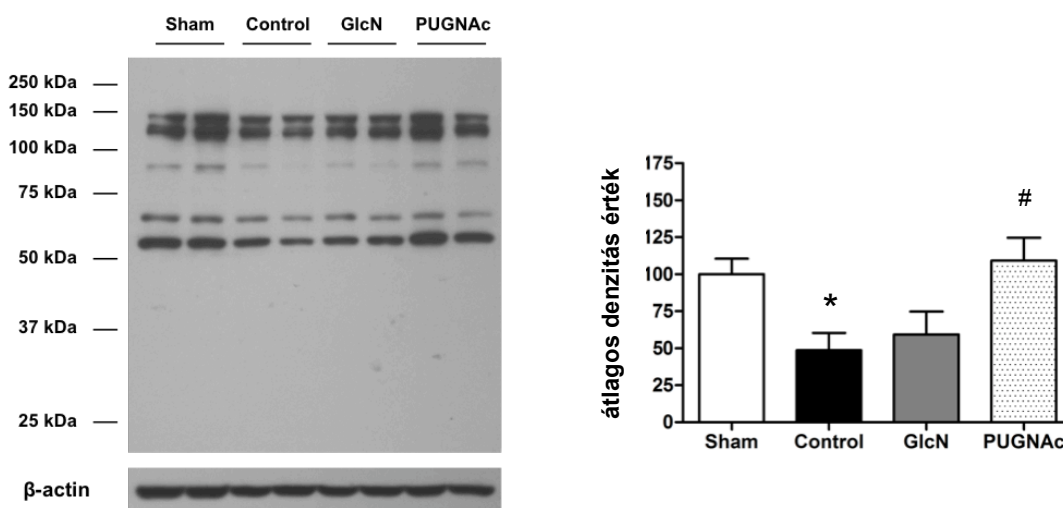
Protein O-GlcNAc and foszforilációs szintek

A májban szignifikáns, több, mint 50%-os csökkenés következett be a fehérjék O-GlcNAc szintjében 24 órával a traumás kivérzéses shock hatására az áloperált csoporthoz viszonyítva; ugyanakkor a PUGNAc kezelés szignifikánsan emelkedett O-glikozilációt eredményezett a kontroll csoporthoz viszonyítva. A glükózamin kezeléssel azonban nem sikerült megelőzni a szöveti O-GlcNAc szint csökkenését (4. ábra).

A globális O-GlcNAc módosulás mellett felmértük mind a szerin, mind a threonin foszforilációt a májszövetből vett mintákban. A szerin rezidumokon létrejövő foszforiláció szignifikánsan emelkedett mind a glükózamin, mind a PUGNAc csoportban a kontrollhoz viszonyítva; emellett a PUGNAc-el kezelt csoportban a szerin foszforiláció szignifikánsan emelkedést mutatott az áloperált állatokéhoz képest is. Ezzel ellentétben, a májszövetben lévő proteinek threonin foszforilációja szignifikáns csökkenést mutatott mind a kontroll, mind a glükózamin csoporthoz képest.

A fehérjék O-GlcNAc szintje a májszövetben szignifikáns negatív korrelációt mutatott a szövetkárosodást jelző paraméterekkel: ALT ($r=-0.71$, $p<0.05$), AST ($r=-0.75$, $p<0.05$), LDH ($r=-0.76$, $p<0.05$) és az apoptózissal ($r=-0.63$, $p<0.05$). Ugyancsak mérsékelt, de szignifikáns korrelációt találtunk az O-GlcNAc módosulás mértéke és a folyadékpótlást követően mért szérumban laktát szint között ($r=-0.54$, $p<0.05$).

A tüdőből vett mintákban ugyancsak szignifikáns csökkenést találtunk a traumás kivérzéses shock hatására. Hasonlóan a májhoz, a csökkenést egyedül a PUGNAc adása előzte meg, míg a glükózamin kezelés nem mutatott szignifikáns hatást a 24 órás időpontban vett mintákban. A fehérjék O-GlcNAc módosulása hasonló mintázatot mutatott a szívben, azonban ezen értékek nem érték el a statisztikailag szignifikáns határt (ANOVA, $p=0.07$).



4. ábra: O-GlcNAc módosulás a májszövetből vett mintákban 24 órával hemorrhagiás shock-ot és kezelést követően. Reprezentatív immunoblott az ábra bal oldalán 2-2 kiválasztott minta O-GlcNAc módosulását mutatja be. Oszlopdiagramm a jobb oldalon: normalizált denzitás értékek átlaga \pm SEM. A denzitás értékeket β -actin festéshez viszonyítottuk az egyenlő feltöltés ellenőrzése érdekében. Eredmények: átlag \pm SEM, $n=7$ minden csoportban, ANOVA: * $p \leq 0.05$ Vs Sham (Áloperált) és # $p \leq 0.05$ Vs Control.

MEGBESZÉLÉS

I. Az emelkedett O-GlcNAc szint hatásának vizsgálata a rövid-távú kimenetelre súlyos traumás hemorrhagiás shock-ot követően patkányokban

Eredményeink alapján igazolást nyert, hogy minimális térfogatú, bolus glükózamin adása hemorrhagiás shock-ban szignifikánsan javítja a 2 órás túlélést további folyadékpótlás szükségessége nélkül (47% Vs 20%). Emellett, szignifikáns emelkedést észleltünk a glükózaminnal kezelt csoportban 18 perces időtartamra a kezelést követően. Hasonlóan korábbi tanulmányokhoz, a glükózamin kezelés szignifikánsan emelkedett protein O-GlcNAc szintet eredményezett a szívben, a májban és az agyban. Tekintettel arra, hogy a kontroll (mannitol) és a glükózamin oldat osmolaritása közel egyenlő volt, a glükózamin túlélésre gyakorolt hatásának hátterében nagy valószínűséggel nem az ozmotikus, hanem a metabolikus hatása áll.

A hypovolémiás shock kialakulásával párhuzamosan metabolikus acidosis lépett fel, melyet az emelkedett laktát és a csökkent pH, PAO_2 , base excess (BE) és bikarbonát szintek jeleznek. Míg a metabolikus acidosis javulása általában összhangban áll a kedvezőbb kimenetellel, 30 perccel a kezelést követően nem találtunk szignifikáns különbséget a vérgáz paraméterekben a kontroll és a glükózaminnal kezelt csoportokat összehasonlítva – jelezve, hogy a glükózamin kezelés nem volt hatással a metabolikus acidosisra a mérés idején.

A trauma okozta súlyos hemorrhagiás shock velejárója a csökkent cardiac output és perifériás szöveti perfúzió. Ennek következményeként neuroendokrin reflexek aktiválódnak, centralizált keringés és perifériás vazokonstrikció lép fel. Eredményeink azt mutatták, hogy a glükózamin kezelés szignifikáns emelkedést eredményezett az artériás középnyomásban (mean arterial pressure, MAP) rövid időtartamra, közvetlenül a kezelést követően. Minden egyéb metabolikus és hemodinamikus hatás hiányában, feltételezzük, hogy a MAP átmeneti emelkedése acut vasoaktiv és / vagy a neuroendokrin válasza gyakorolt hatás eredménye, melynek következtében további vazokonstrikció lépett fel.

A szövetek bioenergetikai státuszának fenntartása, különösen az ATP szint megőrzése, jelentős hatással bír a túlélésre, ezért meghatároztuk a szöveti ATP szintet különböző szervekben 30 perccel a kezelést követően, amikor a mannitollal kezelt kontroll állatok túlélési százaléka csökkenni kezdett. A glükózamin kezelés azonban nem volt hatással a szöveti ATP szintekre a tanulmányozott szervekben. Mindez arra enged következtetni, hogy a glükózamin túlélésre gyakorolt pozitív hatását nem közvetlenül a bioenergetikai státusz javítása révén érte el.

A szérum cytokinek 30 perccel a hemorrhagiás shock-ot és a kezelést követően kisfokú emelkedést mutattak, mely változásra a glükózamin kezelés nem volt hatással. Az irodalmi adatok alapján a szérum cytokin szintek elsősorban elhúzódó folyadékpótlást követően mutatnak szignifikáns emelkedést a reperfúziós károsodás következményeként, míg a teljes folyadékpótlás illetve a folyadékpótlás hiánya nem okoz azonnali szignifikáns cytokin emelkedést.

Az emelkedett szöveti O-GlcNAc szint a szívben, a májban és az agyban 30 perccel a kezelést követően ugyan nem jelent direkt ok-okozati kapcsolatot a túlélés és a szöveti O-glikoziláció között, ezen eredmények összhangban állnak azon irodalmi adatokkal, melyek szerint az emelkedett O-GlcNAc szint és a túlélési százalék javulása egyszerre figyelhető meg. Meglepő módon, nem találtunk szignifikáns különbséget a fehérjék O-glikozilációjában azon kontroll vagy glükózaminnal kezelt állatokat összehasonlítva, melyek túléltek a 2 órás megfigyelési időszakot vagy nagyjából egy időpontban hullottak el. Tekintettel arra, hogy a fehérjék O-GlcNAc módosulása igen gyorsan (akár másodpercek alatt) változhat, lehetséges, hogy a 2 órás időintervallum végére a glükózamin okozta O-GlcNAc emelkedés már visszatért az eredeti szintre.

Az emelkedett O-GlcNAc módosulás eredményezte védő hatás hátterében álló mechanizmusok pontos meghatározása még várat magára. Ugyanakkor irodalmi adatokból

tudjuk, hogy az O-GlcNAc szintek változása fontos szerepet játszik különböző jeltáviteli útvonalak módosításában, így hatással van a p42/44 és p38 mitogen aktiválta protein kinázok (MAPK) aktivitására. Emelkedett O-GlcNAc módosulásról szintén kimutatták, hogy növeli a hő-shock fehérje (heat shock protein) HSP 70 és 40 expresszióját.

A minimális vagy korlátozott volumenű folyadékpótlás az előnyben részesített stratégia a hemorrhagiás shock kezelésében harctéri körülmények között, illetve a pre-hospitális ellátás során, mielőtt a vérvesztés megállító sebészeti kezelésre lehetőség adódik. Ezen szituációkban a sebészeti beavatkozást megelőző nagy-volumenű folyadékpótlás ugyanis további vérvesztést okozna. A kísérleteink során alkalmazott glükózamin térfogata 150-250 ml-et jelentene egy átlagos, 70 kg-os testű sérült számára, mely térfogat tovább csökkenthető koncentráltabb oldat készítésével. Ezen térfogatú folyadék könnyen szállítható a hadszíntéren az erre kiképzett elsősegélynyújtók által.

A mindennapi gyakorlatban per oralisan alkalmazott dózisú glükózamin által elért szérumszint jóval a mmol-os nagyságrendű, irodalmi adatok alapján sejtvédő hatással bíró koncentráció alatt marad ugyan, de jelzi, hogy toxikus mellékhatást a napi gyakorlatban adott glükózamin (1-1.5g) nem okoz. Mindezek mellett, 20 egészséges, fiatal önkéntesen végzett kísérlet adatai alapján, 5 órás folyamatos intravénás glükózamin infúzió adása 4 $\mu\text{mol/dL/min}$ dózisban 0.4-0.8 mM szérumszintet eredményezett, minden káros mellékhatás nélkül.

II. Az emelkedett O-GlcNAc szint hatásának vizsgálata a későbbi kimenetelre súlyos traumás hemorrhagiás shock-ot követően patkányokban

Az elvégzett kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a proteinek O-GlcNAc szintjének növelése glükózamin formájában biztosított szubsztrát-többlet adása vagy az O-GlcNAc csoport leválasztásának PUGNAc-el történő gátlása révén szignifikánsan javítja a 24 órás túlélést súlyos, traumával kombinált hemorrhagiás shock-ot és teljes folyadékpótlást követően patkányokban. Amíg mindkét kezelési protokoll javította a túlélést, csak a PUGNAc kezelés csökkentette szignifikánsan a hemorrhagiás shock kiváltotta gyulladásos válaszreakciót és szervkárosodást.

Az általunk alkalmazott terápiás protokoll alapján mind a glükózamin, mind a PUGNAc két részletben került beadásra: közvetlenül a kivéreztetést követően, majd folyamatosan a folyadékpótlás alatt. Ezzel a megközelítéssel a valós életben leggyakrabban előforduló helyzetet kívántuk modellezni, mely során a súlyos vérvesztést követően először egy kisebb i.v. dózis kerül beadásra a helyszínre érkező mentőorvos vagy harctéri elsősegélynyújtó által. A nyomás-kontrollált fázis modellezi a szállítás idejét, melyet a sebészeti beavatkozás után az intenzív osztályon vagy a hadászati sebészeti ellátó központban (Primary Battalion Station / Forward Surgery Setting) történő teljes folyadékpótlás során folyamatosan adagolt második dózis követ a reperfüziós károsodás csökkentése érdekében.

Kiemelkedő fontossággal bír, hogy mind a glükózamin (85%), mind a PUGNAc (86%) kezelés szignifikánsan javította a túlélési százalékot a kontroll csoporthoz viszonyítva (53%). Tekintettel arra, hogy az állatok jórésze az első 6 órában pusztult el, a növekedett túlélés és a jobb vér-gáz paraméterek mindkét kezelt csoportban nagy valószínűséggel a korai protektív hatás eredménye. Mindez összefügg azzal a ténnyel, hogy a szérumszint és a vér-gáz paraméterek kedvezőbb értékeket mutattak mindkét kezelt csoportban a korai időszakban. Irodalmi adatok alapján azon betegek állapota, akik az intenzív osztályra kerüléskor korai, súlyos fokú acidosiszt mutatnak, könnyebben progrediál többszervi elégtelenség irányába. Ellentétben azzal, hogy mindkét kezelés javította a túlélést és segítette megelőzni a korai acidosis kialakulását, egyedül a PUGNAc kezelés bizonyult hatékonynak a későbbi, gyulladásos válaszreakció és a szervi károsodás megelőzésében a 24 órás időpontban elvégzett mérések idején.

A fehérjék O-GlcNAc módosulása jelentősen csökkent a tüdőben és a májban 24 órával a hemorrhagiás shock-ot követően, míg a PUGNAc kezelés hatékonynak bizonyult az O-glikozilációs szint fenntartásában. Érdemes megemlíteni, hogy az O-GlcNAc módosulás, hasonlóan a foszforilációhoz, ugyancsak a szerin/threonin csoportokon jön létre. Bár

léteznek fehérjék, melyek kizárólag csak O-glikozilációnak vagy foszforilációnak vannak kitéve, más proteinek egyszerre O-glikozilálódhatnak és foszforilálódhatnak különböző kombinációkban. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a májszövetben lévő proteinek O-GlcNAc szintje párhuzamosan változott a szerin foszforilációval és reciprok módon változott a threonin foszforilációval traumás kivérzéses shock-ot követően.

A folyadékpótlást és a reperfúziós károsodást követő O-GlcNAc szint csökkenés egybevág korábbi kísérleti eredményekkel, ugyanakkor, látszólag ellentétes azzal a nézettel, mely szerint az emelkedett O-GlcNAc módosulás stressz-indukálta válaszreakció. Mindamellett korábbi tanulmányok már igazolták, hogy a proteinek O-GlcNAc szintjének emelkedése viszonylag gyors válaszreakcióként jön létre ischémiát követően, melyet a későbbiekben a reperfúzió során az O-GlcNAc szintek csökkenése követ. Jelen tanulmányunkban azt találtuk, hogy a PUGNAc által szinten tartott O-glikoziláció negatív korrelációt mutat a szöveti károsodás indikátoraival és az apoptosissal 24 órával, illetve a szérum laktát szinttel közvetlenül a hemorrhagiás shock-ot követően.

Azon mechanizmus(ok), melyek a stressz kiváltotta O-GlcNAc emelkedést okozzák, még távolról sem tisztázottak: feltehetőleg ezen történések hátterében az O-GlcNAc-transzferáz és az O-GlcNAcáz enzimek aktivitásának külön-külön, vagy egyszerre történő változása állhat, melyhez hozzáadódik a szubsztrát szint elérhetőségének változása, melyet a hexózin bioszintézis útvonal biztosít. Azon tény, mely szerint az O-GlcNAc csoport szintézisének növelése glükózamin adásával kevésbé bizonyult protektívnek az O-GlcNAc csoport leválasztását gátló PUGNAc kezeléshez képest, valószínűleg a glükózamin rövidebb fél-életidejével magyarázható. Másik lehetséges magyarázat, hogy az O-GlcNAc szint csökkenése a kontroll csoportban megemelkedett O-GlcNAcáz aktivitás eredménye, melyet a PUGNAc kezelés célzottan gátol.

Mindazonáltal eredményeink azt mutatják, hogy a jobb túlélés azon korai események következménye, amikor az O-GlcNAc szintek csökkenését mind a glükózamin, mind a PUGNAc hatékonyan előzi meg. Ugyanakkor, protektív hatását a gyulladásos válaszreakció és a szöveti károsodás terén csak a hosszabb hatásidejű PUGNAc tudta kifejteni.

Annak érdekében, hogy direkt ok-okozati összefüggést tudjunk kimutatni az emelkedett O-glikoziláció és a túlélés között, transzgenikus állatokon végzett kísérletek szükségesek. Ezt nehezíti, hogy az OGT gén deléciója embrionikusan letális, az OGT overexpressziója pedig inzulin rezisztenciát okoz. Szövetspecifikusan génmanipulált állatok vagy az OGT enzim akut adenovírus transzfekcióval történő átvitele képezhet potenciális alternatívát, azonban a hypovolémiás shock egyszerre érinti az összes vitális szervet, ezért jelenleg még nem tisztázott, mely szövetek vagy szervrendszerek célzott transzfekciója szolgálna hasznos eredménnyel. Nemrégén új, a PUGNAc-nél szelektívebb O-GlcNAcáz gátlók (NAG-thiazolines) és OGT inhibitorok (TTO4) váltak elérhetővé, melyek a jövőben végzett tanulmányok során jóval specifikusabb eredményekkel szolgálhatnak. A NAG-thiazolinokról izolált perfundált szíveken végzett kísérletek során már bizonyítást nyert, hogy szignifikánsan növelik a fehérjék O-GlcNAc szintjét és a fiziológias hatékonyságuk is igazolódott.

Fontos megemlíteni, hogy az IgM-alapú monoclonális CTD 110.6 antitest nem fehérje specifikusan magát az O-GlcNAc csoportot ismeri fel, ezért az immunoblottok számos pozitívan festődő sávot mutatnak. Utóbbi időben új, monoclonális IgG alapú O-GlcNAc specifikus antitestek kerültek kifejlesztésre, melyek nemcsak az O-GlcNAc módosulás detektálására, hanem immunoprecipitációra és az O-glikozilált kötőhely meghatározására is jól használhatók. Ugyancsak lényeges, hogy a tanulmányozott szövetekben igen nagyszámú fehérje célpontja az O-GlcNAc módosulásnak. Az új IgG alapú monoclonális antitestek segítségével széles-skálájú, O-glikozilált protein dúsítást követően elvégzett 'shotgun' proteomics vizsgálat segítségével közel 200, O-GlcNAc módosulásnak kitett, emlős szövetből származó proteint sikerült azonosítani, melyek között nagy számban szerepelnek újonnan identifikált glikoproteinek. Jelenleg is folynak kutatások azon proteinek azonosítására, melyek O-GlcNAc szintje változást mutat traumás kivérzéses shock, illetve glükózamin vagy PUGNAc kezelés hatására.

ÚJ EREDMÉNYEK

» **Az emelkedett O-GlcNAc szint hatásának vizsgálata a rövid-távú kimenetelre súlyos traumás hemorrhagiás shock-ot követően patkányokban**

- Eredményeink alapján igazolást nyert, hogy minimális térfogatú, bolus glükózamin adása súlyos traumás hemorrhagiás shock-ban szignifikánsan javítja a 2 órás túlélést további folyadékpótlás igénye nélkül.
- Emellett, szignifikánsan emelkedett artériás középnyomást észleltünk a glükózaminnal kezelt csoportban 18 perces időtartamra a kezelést követően.
- A glükózamin adása szignifikánsan emelkedett protein O-GlcNAc módosulást eredményezett a szívből, a májból és az agyból vett szöveti mintákban.

» **Az emelkedett O-GlcNAc szint hatásának vizsgálata a későbbi kimenetelre súlyos traumás hemorrhagiás shock-ot követően patkányokban**

- Az elvégzett kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a proteinek O-GlcNAc szintjének növelése glükózamin formájában biztosított szubsztrát-többlet adása, vagy az O-GlcNAc csoport leválasztásának PUGNAc-el történő gátlása révén szignifikánsan javítja a 24 órás túlélést súlyos, traumával kombinált hemorrhagiás shock-ot és teljes folyadékpótlást követően patkányokban.
- Amíg mindkét kezelési protokoll javította a túlélést, csak az O-GlcNAcáz inhibitor PUGNAc kezelés csökkentette szignifikánsan a hemorrhagiás shock kiváltotta gyulladásos válaszreakciót, apoptózist és szervkárosodást.
- A fehérjék O-GlcNAc módosulása jelentősen csökkent a tüdőben és a májban 24 órával a hemorrhagiás shock-ot és folyadékpótlást követően, míg a PUGNAc kezelés hatékonynak bizonyult az O-glikozilációs szint fenntartásában.
- Kísérleteink során azt találtuk, hogy a májszövetben lévő proteinek O-GlcNAc szintje párhuzamosan változott a szerin foszforilációval és reciprokan változott a threonin foszforilációval 24 órával a traumás kivérzéses shock-ot követően.
- Jelen tanulmányunkban azt találtuk, hogy a növekedett O-GlcNAc szint negatív korrelációt mutat a szöveti károsodás indikátoraival és az apoptosissal 24 órával, illetve a szérumban a laktát szinttel közvetlenül a hemorrhagiás shock-ot követően.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy azon metabolikus kezelési formák, melyek a szöveti O-GlcNAc szintek növelésén alapulnak, új lehetőséget nyithatnak a hemorrhagiás shock kezelésében. Emellett, a növekedett protein O-GlcNAc módosulás segíthet megelőzni a szisztémás gyulladásos válaszreakciót és annak következményeként kialakuló többszervi elégtelenséget, csökkentve a súlyos sérülések korai és késői halálozási arányát.

KÖZLEMÉNYEK ÉS KONFERENCIÁK

Közlemények impakt-faktoral rendelkező folyóiratban:

1. **Nőt LG**, Marchase RB, Fülöp N, Brocks CA, Chatham JC: Glucosamine administration improves survival rate after severe hemorrhagic shock combined with trauma in rats. *Shock* 28(3):345-52, 2007. **IF: 3.325**
2. Chatham JC, **Nőt LG**, Fülöp N, Marchase RB: Hexosamine biosynthesis an protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia and trauma. *Shock* 29(4):431-40, 2008. **IF: 3.394**
3. Fülöp N, Feng W, Xing D, He K, **Nőt LG**, Brocks CA, Miller AP, Chatham JC: Aging leads to increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine in heart, aorta, brain and skeletal muscle in Brown-Norway rats. *Biogerontology* 9(3):139-51, 2008. **IF: 3.000**
4. Xing D, Feng W, **Nőt LG**, Miller AP, Zhang Y, Chen YF, Majid-Hassan E, Chatham JC, Oparil S: Glucosamine Inhibits Inflammatory and Neointimal Responses to Acute Endoluminal Arterial Injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(1):H335-42, 2008. **IF: 3.643**
5. **Nőt LG**, Brocks CA, Várhidy L, Marchase RB, Chatham JC: Increased O-linked beta-N-acetylglucosamine levels on proteins improves survival, reduces inflammation and organ damage 24 hours after trauma-hemorrhage in rats. *Crit Care Med* 38(2):562-71, 2010. **IF: 6.373**
6. Teo CF, Ingale S, Wolfert MA, Elsayed GA, **Nőt LG**, Chatham JC, Wells L, Boons GJ: Glycopeptide-specific monoclonal antibodies suggest new roles for O-GlcNAc. *Nat Chem Biol* 6(5):338-43, 2010. **IF: 16.058**

Összesített impakt faktor:	35.793
Összesített citáció:	60
Független citáció:	41

Válogatott Konferenciák:

1. **Nőt LG**, Marchase RB, Fülöp N, Brocks CA, Chatham JC: Glucosamine administration improves survival rate after severe trauma-hemorrhage in rats. Experimental Biology, San Francisco, California, April 2006. *FASEB J* 20:1471, 2006. **IF: 6.721**
2. Chen JG, **Nőt LG**, Ng T, Hubbard WJ, Chatham JC, Choudry MA, Bland KI, Choudry IH: 17β-Estradiol (E2) administration after major blood loss improves liver ATP, 3-hour survival and also long-term survival following prolonged hypotension (3 hour) and fluid resuscitation. 29th Annual Conference on Shock, Broomfield, Colorado, June 2006. *Shock* 25(6):11, 2006. **IF: 3.318**
3. **Nőt LG**, Brocks CA, Fülöp N, Marchase RB and Chatham JC. Protein O-glycosylation improves survival and effects cytokine release following trauma-hemorrhage in rats. American Heart Association Scientific Sessions, Chicago, Illinois, November 2006. *Circulation* 114: II-422, 2006. **IF: 10.940**
4. Fülöp N, Feng W, Xing D, He K, **Nőt LG**, Brocks CA, Marchase RB, Miller AP, Chatham JC: The effect of aging on hexosamine biosynthesis pathway and on O-linked N-acetylglucosamine levels in rats. Experimental Biology, Washington DC, April 2007. *FASEB J* 21:908.9, 2007. **IF: 6.791**
5. **Nőt LG**, Brocks CA, Marchase RB, Chatham JC: O-GlcNAc agonist treatment improves survival, reduces inflammation and organ damage 24 hours after trauma-hemorrhage in rats. Experimental Biology, San Diego, CA, April 2008. *FASEB J* 22:1227.5, 2008. **IF: 7.049**

6. Chatham JC, Zou L, **Nöt LG**, Laczy B., Marchase RB: Protein O- GlcNAcylation: A critical regulator of the cellular response to stress. Annual Conference of the Society for Glycobiology, San Diego, CA, November, 2009. *Glycobiology* 19(11):1259-1379, 2009.

IF: 3.929

7. Teo CF, Ingale S, Wolfert MA, Elsayed GA, **Nöt LG**, Chatham JC, Wells L, Boons GJ: Generation of O-GlcNAc specific monoclonal antibodies using a novel synthetic immunogen. Experimental Biology, Anaheim, CA, April 2010. *FASEB J* 24:904.7 2010.

IF: 6.401

8. **Nöt LG**, White CR, Várhidy L, Chatham JC: O-GlcNAc agonist treatment attenuates early inflammatory response in the lung after cecal puncture and ligation induced sepsis in rats. Experimental Biology, Anaheim, CA, April 2010. *FASEB J* 24:788.1 2010.

IF: 6.401

Konferenciák összesített impakt faktora: 51.550

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani **Róth Erzsébet Professzor Asszonynak** (Sebészeti Oktató és Kutató Intézet, Általános Orvostudományi Kar, Pécsi Tudományegyetem, Pécs) és **Professzor John C. Chatham-nek** (Division of Cardiovascular Diseases, Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, USA) a munkám során nyújtott segítségükért. Ugyancsak köszönettel tartozom **Professor Richard B. Marchase-nek** (Vice president of University of Alabama at Birmingham) hasznos tanácsaiért.

Köszönettel tartozom **Dr Várhidy László docensnek** és **Illés Tamás Profeszornak** a segítségükért és támogatásukért. Ugyancsak hálával tartozom **Miseta Attila** és **Bogner Péter Professzoroknak** támogatásukért és hasznos tanácsaikért.

Köszönet illeti a **Mozgásszervi Sebészeti Intézet, Traumatológiai és Kézsebészeti Klinikai Tanszékén** és az **Ortopédia Klinikai Tanszékén** dolgozó kollégáimat. Szintén köszönet illeti **Professzor Nyárády Józsefet** és **Dr Farkas Gábort**, pályám kezdetén nyújtott támogatásukért és segítségükért.

Ugyancsak hálával tartozom **Dr John C. Chatham laboratóriumában** dolgozó munkatársaimnak, különösen **Charlye A. Brocks-nak**, **Sue A. Marsh-nak**, **Fülöp Norbertnek** és **Nagy Tamásnak** a közös munkánk során nyújtott segítségükért – ők nemcsak munkatársaim, de barátaim is egyben. Köszönettel tartozom **Tunyogi-Csapó Miklósnak** barátságáért és támogatásáért. Külön hálás vagyok **Laczy Boglárkának**, aki mindig mellettem állt, amikor szükségem volt rá.

Ugyancsak köszönöm **Professzor Suzanne Oparil**, **Professzor Yui-Fai Chen**, **Dr Roger C White** és **Dr Andrew Paterson** (University of Alabama at Birmingham), valamint **Chin Fen Teo**, **Professzor Lance Wells** és **Geert-Jan Boons** (University of Georgia, Athens, Georgia, USA) közös munkánk során nyújtott segítségüket.

Végül, de nem utolsósorban hálásan köszönöm **családomnak** és **barátaimnak**, hogy mindig mellettem álltak és segítségükre bármikor számíthattam.